

СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФИКСАТОРА НАВАШИНА

Буданцев А.Ю., Медведев Б.И.

ФГБНУ «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук», Пущино, Россия, e-mail: budantsev@mail.ru

Показано, что сразу же после смешивания реагентов фиксатора Навашина, в результате окислительно-восстановительной реакции Cr (VI) восстанавливается до Cr (III), снижается концентрация формальдегида и образуется муравьиная кислота. Через 24 ч этот процесс прогрессирует. Продукт реакции с максимумом поглощения 580 нм представляет, вероятно, ацетат хрома (III). Таким образом, фиксатор Навашина является химически нестабильной смесью, и фиксация происходит в нестационарном растворе переменного состава, который включает хромовую кислоту, формальдегид, уксусную кислоту, муравьиную кислоту и ацетат хрома (III). Предлагается двухступенчатый протокол применения фиксатора Навашина: фиксация ткани в смеси формалин + уксусная кислота и, после тщательной промывки, инкубация с хромовой кислотой («хромирование»). Это позволит избежать влияния дополнительных продуктов окислительно-восстановительной реакции при фиксации.

Ключевые слова: фиксатор Навашина, спектры хромовой кислоты, динамика восстановления хрома Cr (VI), протокол фиксации.

SPECTRAL STUDY OF NAVASCHIN'S FIXATIVE

Budantsev A.Y., Medvedev B.I.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Puschino, Russia, e-mail: budantsev@mail.ru

Immediately after mixing the reagents of the Navashin's fixative, a redox reaction between the components of the mixture begins. Cr (VI) is reduced to Cr (III), decrease the concentration of formaldehyde and the formation of formic acid. After 24 h, an intensive formation of Cr (III) and a decrease in the concentration of Cr (VI) occur. The reaction product with the absorption maximum at 580 nm is probably chromium acetate (III). Thus, the Navashin's fixative is a chemically unstable mixture, and the fixation occurs in a nonstationary solution of a variable composition, which includes chromic acid, formaldehyde, acetic acid, formic acid, and chromium acetate (III). Based on the results of this study, a two-step protocol of applying the Navashin's fixative can be proposed: the fixation of a tissue in the formalin + acetic acid mixture and, after thorough washing, the treatment with chromic acid (tissue "chromizing"). This protocol would make it possible, at least, to avoid the effect of additional redox reaction products on the tissue inside the Navashin's fixative.

Keywords: Navashin's fixative, spectrum of chromic acid, dynamics of Cr(VI) reduction, protocol of fixation.

Фиксация тканей животных, растений и человека различными химическими реагентами представляет первый этап подготовки препаратов для микроскопии. Во время фиксации происходит остановка биохимических процессов в нативной ткани при условии максимального сохранения морфологической архитектуры тканей.

В большинстве случаев используются сложные фиксаторы, включающие смесь соединений с высокой химической активностью: органические растворители, окислители, восстановители, буферные системы, вещества, вызывающие конформационные изменения внутриклеточных макромолекул, и др. [9 и др.]. Многие составы и концентрации фиксирующих реагентов, входящих в сложные фиксаторы, определены эмпирическим путем, и механизмы взаимодействия реагентов между собой в фиксаторе и с фиксируемыми клетками часто не изучены. Это приводит к увеличению «неопределенности» полученных результатов [6].

Фиксатор, в состав которого входят хромовая кислота, формальдегид и ледяная уксусная кислота, в литературе известен как фиксатор Навашина. Данная смесь была предложена С.Г. Навашиным в 1912 году для гистологической фиксации растительных объектов и активно используется до настоящего времени [1; 3; 4].

Хорошо известно, что соединения Cr (VI) представляют сильные окислители, а формальдегид является активным восстановителем. Однако кинетика окислительно-восстановительных реакций в фиксаторе Навашина между хромовой кислотой, формальдегидом и уксусной кислотой не исследована, хотя все, кто использовал этот фиксатор, наблюдали быстрое и резкое изменение цвета фиксатора после слияния указанных реагентов.

В данной работе представлены результаты спектрального анализа восстановления Cr (VI) до Cr (III), и кинетики реакций, связанных с восстановлением хрома формальдегидом в присутствии уксусной кислоты (пропорции взаимодействующих реагентов соответствуют смеси фиксатора Навашина).

Материал и методы

Все измерения спектров изученных растворов проводились на спектрофотометрах Specord UV (Цейс, Германия) и Shimadzu UV-2401PC (Япония). Растворы готовились на дистиллированной воде из следующих реагентов: хромовый ангидрид, 37%-ный раствор формалина и ледяная уксусная кислота. Состав фиксатора Навашина: 1%-ный раствор CrO₃, 16%-ный раствор формалина и ледяная уксусная кислота в пропорции 10:4:1 (v/v). Концентрация хромовой кислоты в фиксаторе Навашина равна 7×10^{-2} М.

Исходный раствор CrO₃ (концентрация 0,1 М) имеет значения оптической плотности (D) значительно выше 2,0. Чтобы записывать спектры поглощения раствора CrO₃ в пределах 1,4 D (шкала спектрофотометра Спекорд), использовались разбавление исходного раствора CrO₃ в 100 раз и кюветы толщиной 0,5 см. Аналогично измерялись спектры поглощения раствора фиксатора Навашина.

Измерение спектров в длинноволновой части спектра (ионы Cr (III)) проводилось без разведения исходного раствора фиксатора в кюветах толщиной 2 мм.

Результаты измерений

1. Спектр поглощения хромовой кислоты (водный раствор CrO₃)

Спектр поглощения хромовой кислоты в концентрации 10^{-3} М имеет три полосы поглощения: два пика в ультрафиолетовой области – 258 нм и 351 нм и один, минорный, плохо разрешенный пик, в области 436 нм. В табл. 1 приведены цифровые значения D в области максимумов спектра (Шимадзу).

Таблица 1

Значения D в максимумах спектра раствора CrO₃

| | D (толщина кюветы - 0,5 см) | | |
|---|-----------------------------|--------------|--------------|
| | 258 нм | 351 нм | 436 нм |
| 1. Раствор CrO ₃ (10 ⁻³ М) | 1,134 | 0,837 | 0,116 |
| 2. Раствор CrO ₃ (7x10 ⁻⁴ М) (фиксатор Навашина) | 0,702 | 0,524 | 0,071 |

Результаты измерений калибровочных спектров растворов хромовой кислоты в диапазоне концентраций 10⁻³ – 10⁻⁴ М и расчеты коэффициентов молярной экстинции (ε, л / моль· см) приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты измерения значений оптической плотности для разных концентраций CrO₃ и расчета коэффициента молярной экстинции (ε, л / моль· см)

| № | Вода, мл | Раствор CrO ₃ 10 ⁻³ М, мл | Концентрация, М | Кювета 0,5 см | | | | |
|----|----------|---|---------------------|---------------|------|--------|------|----------|
| | | | | 258 нм | | 351 нм | | 436 нм D |
| | | | | D | ε* | D | ε* | |
| 1 | 9 | 1 | 10 ⁻⁴ | 0,10 | 2000 | 0,08 | 1600 | 0,01 |
| 2 | 8 | 2 | 2 x10 ⁻⁴ | 0,20 | 2000 | 0,16 | 1600 | .. |
| 3 | 7 | 3 | 3 x10 ⁻⁴ | 0,31 | 2066 | 0,24 | 1600 | .. |
| 4 | 6 | 4 | 4 x10 ⁻⁴ | 0,42 | 2100 | 0,31 | 1550 | .. |
| 5 | 5 | 5 | 5 x10 ⁻⁴ | 0,52 | 2080 | 0,39 | 1560 | .. |
| 6 | 4 | 6 | 6 x10 ⁻⁴ | 0,64 | 2133 | 0,46 | 1533 | .. |
| 7 | 3 | 7 | 7 x10 ⁻⁴ | 0,74 | 2114 | 0,54 | 1542 | .. |
| 8 | 2 | 8 | 8 x10 ⁻⁴ | 0,84 | 2100 | 0,62 | 1550 | .. |
| 9 | 1 | 9 | 9 x10 ⁻⁴ | 0,94 | 2088 | 0,70 | 1555 | .. |
| 10 | 0 | 10 | 10 ⁻³ | 1,06 | 2120 | 0,78 | 1560 | 0,10 |

* Расчет коэффициента молярной экстинции $\epsilon = D/C \cdot l$, где D – оптическая плотность, C – концентрация моль/л и l – толщина кюветы в см

2. Спектры поглощения фиксатора Навашина:

а) измерение концентрации ионов хрома (VI). Как отмечено выше, из свежеприготовленной смеси фиксатора Навашина бралась аликвота, разбавлялась в 100 раз, и сразу же регистрировался спектр разбавленного фиксатора в кювете толщиной 5 мм. Аналогично измерения проводились через разные промежутки времени. Результаты одного из опытов измерения динамики изменения спектров хромовой кислоты приведены в таблице 3.

Таблица 3

Динамика изменения оптической плотности раствора фиксатора Навашина в течение 48 часов после приготовления фиксатора

| Состав раствора | | Оптическая плотность D | | | | | |
|-----------------|---|------------------------|---|--------|---|--------|---|
| | | 258 нм | | 351 нм | | 436 нм | |
| | | D | % | D | % | D | % |
| 1 | 10 ⁻³ М раствор CrO ₃ | 1,12 | % | 0,82 | % | 0,14 | % |

| | | | | | | | |
|----|---|------|-------|------|-------|------|-------|
| 2 | Смесь Навашина (разбавление в 100 раз) 0.00* | 0,78 | 100,0 | 0,66 | 100,0 | 0,10 | 100,0 |
| 3 | -----«----- 3.30 | 0,38 | 48,7 | 0,26 | 39,4 | 0,04 | 40,0 |
| 4 | -----«----- 6.30 | 0,32 | 41,0 | 0,20 | 30,3 | 0,04 | 40,0 |
| 5 | -----«----- 9.30 | 0,28 | 35,9 | 0,16 | 24,2 | 0,02 | 20,0 |
| 6 | -----«----- 24.00 | 0,24 | 30,8 | 0,04 | 6,1 | 0,02 | 20,0 |
| 7 | -----«----- 27.30 | 0,22 | 28,2 | 0,04 | 6,1 | 0,02 | 20,0 |
| 8 | -----«----- 30.30 | 0,22 | 28,2 | 0,04 | 6,1 | 0,02 | 20,0 |
| 9 | -----«----- 33.00 | 0,18 | 23,1 | 0,04 | 6,1 | 0,02 | 20,0 |
| 10 | -----«----- 48.00 | 0,18 | 23,1 | 0,03 | 4,5 | 0,02 | 20,0 |

* Время в часах от начала измерений

Из данных табл. 3 можно рассчитать начальную скорость изменения оптической плотности (в первые три часа): $V(258 \text{ нм}) = 0,01 \text{ D/ч}$; $V(351 \text{ нм}) = 0,009 \text{ D/ч}$ и $V(420 \text{ нм}) = 0,0023 \text{ D/ч}$;

б) измерение концентрации ионов хрома (III). После приготовления в фиксаторе Навашина в спектрах появляется и нарастает максимум в области 580 нм. Данный максимум отражает накопление хрома (III). Результаты одного из опытов, в котором измерялась динамика положения максимума в области 580 нм в течение 48 часов, приведены в таблице 4.

Таблица 4

Динамика изменения оптической плотности фиксатора Навашина в области 580 нм (толщина кюветы 2 мм)

| Состав раствора | | D | % |
|-----------------|----------------------|------|-------|
| 1 | Смесь Навашина 0.00* | 0,10 | 100,0 |
| 2 | -----«----- 3.30 | 0,26 | 260,0 |
| 3 | -----«----- 6.30 | 0,30 | 300,0 |
| 4 | -----«----- 9.30 | 0,46 | 460,0 |
| 5 | -----«----- 24.00 | 0,48 | 480,0 |
| 6 | -----«----- 27.30 | 0,50 | 500,0 |
| 7 | -----«----- 30.30 | 0,51 | 510,0 |
| 8 | -----«----- 33.00 | 0,53 | 530,0 |
| 9 | -----«----- 48.00 | 0,56 | 560,0 |

Начальная скорость изменения оптической плотности (в первые три часа) в области 580 нм равна $V(580 \text{ нм}) = 0,053 \text{ D/ч}$;

в) Измерение спектров поглощения фиксатора Навашина без уксусной кислоты в длинноволновой части спектра.

Через 24 часа после приготовления смеси фиксатора Навашина раствор приобретал отчетливый темно-зеленый цвет, осадка не наблюдалось. В связи с этим возникло предположение о возможности взаимодействия хрома (III) с уксусной кислотой с образованием ацетата хрома. Для проверки этого предположения были поставлены опыты, в которых вместо уксусной кислоты добавлялся эквивалентный объем дистиллированной

воды. Показано, что нарастание оптической плотности раствора фиксатора Навашина без уксусной кислоты значительно ниже, чем в присутствии кислоты. Цвет раствора фиксатора Навашина не был зеленым в случае отсутствия уксусной кислоты даже через 15 и 20 суток после приготовления фиксатора.

Обсуждение результатов

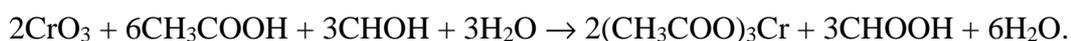
1. Показано, что с момента смешивания реагентов фиксатора Навашина начинается окислительно-восстановительная реакция между компонентами смеси фиксатора. Происходит восстановление Cr (VI) до Cr (III). Восстановление Cr (VI) до Cr (III) должно сопровождаться образованием муравьиной кислоты и уменьшением концентрации формальдегида. Данные об окислительно-восстановительных потенциалах хроматов приведены в нескольких работах [см. 7].

2. Таким образом, фиксатор Навашина представляет *неустойчивую* в химическом отношении смесь, и фиксация происходит в нестационарном растворе переменного состава, включающем: *хромовую кислоту, формальдегид, уксусную кислоту, муравьиную кислоту и ацетат хрома (III)*.

3. Через 24 часа наблюдается значительное образование Cr (III) и падение концентрации Cr (VI). Продукт реакции с максимумом поглощения в области 580 нм Cr (III), по-видимому, является ацетатом хрома (III).

4. Доказательством того, что максимум 580 нм в спектре фиксатора Навашина связан с образованием ацетата хрома, могут служить результаты двух работ. В патенте о синтезе ацетата хрома формула изобретения сформулирована следующим образом: «Способ получения ацетата хрома на основе хромового ангидрида, уксусной кислоты или ее водного раствора и раствора восстановителя, отличающийся тем, что в качестве раствора восстановителя используют раствор формальдегида... в трехступенчатом реакторе проточного типа...» [5].

Как показали Рудь и соавт., при смешивании растворов хромового ангидрида, уксусной кислоты и формальдегида получается ацетат хрома:



Как следует из уравнения реакции, на 1 моль хромового ангидрида требуется 3 моля уксусной кислоты и 1,5 моля формальдегида. Такие условия и разные температуры реагентов (нагрев до 60–70 °С) необходимы для эффективного синтеза ацетата хрома. В фиксаторе Навашина соотношение реагентов следующее: на 1 моль хромового ангидрида приходится 20 молей формальдегида и 17 молей уксусной кислоты. Такое соотношение, т.е. избыток формальдегида и уксусной кислоты, приводит к быстрому восстановлению хрома VI до хрома III и образованию ацетата хрома даже при комнатной температуре.

В другой работе показано, что при восстановлении хрома (VI) в присутствии разных восстановителей (сульфит натрия, аскорбиновая кислота, пероксид водорода) в присутствии уксусной кислоты также образуется ацетат хрома (III) с максимумом поглощения 580–590 нм [2].

5. Действие хрома (III), в частности ацетата хрома, на морфологию клеток недостаточно изучено. Представляют интерес данные о том, что раствор ацетата хрома применяется в качестве протравы при окрашивании ситца. Также известна способность ацетата хрома образовывать сшивки полимерных цепей и регуляции гелеобразования полимерных материалов.

6. Крайне недостаточно данных относительно влияния на клетки муравьиной кислоты, неоднозначны данные о роли уксусной кислоты в составе сложных фиксаторов [10].

7. Известно, что скорость проникновения формальдегида и уксусной кислоты в ткани и модельные системы [6] значительно выше, чем хроматов, приблизительно в 3–4 раза [8]. В связи с этим можно предположить, что собственно фиксация ткани происходит в смеси формальдегида и уксусной кислоты, на фоне которой медленно проникают в ткань продукты восстановленного хрома и других соединений, возникающих в фиксаторе Навашина в ходе окислительно-восстановительной реакции.

8. Механизмы фиксирующего действия хромовой кислоты до конца не изучены. Возможны три варианта: а) прямое коагулирующее действие хроматов на белки, что приводит к их «стабилизации»; б) образование координационных связей с белками, что приводит к образованию прочных связей с протравными красителями (гематоксилин); в) в процессе действия хроматов на тканевые белки включаются оба указанных механизма.

9. На основе результатов данной работы можно предложить *двухступенчатый протокол* применения фиксатора Навашина: сначала проводить фиксацию в смеси формалин+уксусная кислота и затем, после тщательной промывки, провести обработку хромовой кислотой («хромирование» ткани). Наши данные показывают, что такой протокол фиксации позволит, во всяком случае, избежать действия на ткань дополнительных продуктов окислительно-восстановительной реакции внутри фиксатора Навашина.

Работа поддержана Грантом РФФИ (Проект № 14-08-00-295).

Список литературы

1. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М. : МГУ, 2004. - С. 311.

2. Иванов В.М., Щербакова Я.И., Фигуровская В.Н. Оптические и цветометрические характеристики растворов аналитических форм сульфата, хлорида, формиата и ацетата хрома (III) // Вест. Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, сер. 2. Химия. - 2011. – Т. 52, № 6. - С. 413-418.
3. Левицкий Г.А. Опыт цитологического анализа фиксационного действия хром-ацетоформола и хром-формола // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. - 1931. – Т. 27, № 1. – С. 175-186.
4. Навашин М.С. Методика цитологического исследования для селекционных целей. – Изд. 2-е, исправленное. – М. : Гос. изд. колхозной и совхозной литературы «Сельхозгиз», 1936. – С. 86.
5. Рудь М.И., Гаевой Е.Г., Магадов Р.С., Силин М.А., Магадова Л.А. Способ получения ацетата хрома : Патент России № 2186030. 2002. Бюл. № 18.
6. Baker J. Principles of biological microtechnique. A study of Fixtion and Dyening. – London : Methium and Co LTD; New York : Jonh Wiley and Sons Inc., 1958. – P. 201.
7. Casselman W.G.B. Cytological fixation by chromic acid and dichromates // Quart. J. Microscopical Sci. - 1955. - V. 96, part 2. – P. 203-222.
8. Dempster W.T. Rates of Penetration of Fixing Fluids // American Journal of Anatomy. - 1960. – V. 107, N. 1. – P. 59-72.
9. O'Brien T.P., McCully M.E. The study of plant structure principles and selected methods. – Melburn, Australia : Termarcarphi Pty. Ltd., 1981. - P. 322.
10. Zirkle C. The effect of hydrogen ion concentration upon the fixation image of various salts of chromium // Protoplasma. - 1928. - Band 4. – P. 201-227.

Рецензенты:

Брусков В.И., д.х.н., профессор, заведующий лабораторией, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино;

Мирошников А.И., д.б.н., в.н.с., Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино.